

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2002-500374

(P2002-500374A)

(43) 公表日 平成14年1月8日(2002.1.8)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/543	5 0 1	G 0 1 N 33/543	5 0 1 D 4 B 0 2 4
C 0 7 K 17/00		C 0 7 K 17/00	4 B 0 2 9
C 1 2 M 1/00		C 1 2 M 1/00	A 4 B 0 6 3
C 1 2 N 15/09		C 1 2 Q 1/68	A 4 H 0 4 5
C 1 2 Q 1/68		G 0 1 N 33/53	M

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 39 頁) 最終頁に続く

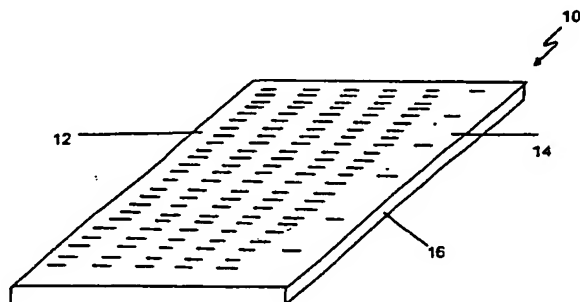
(21) 出願番号 特願2000-527670(P2000-527670)  
(86) (22) 出願日 平成11年1月6日(1999.1.6)  
(85) 翻訳文提出日 平成12年7月7日(2000.7.7)  
(86) 国際出願番号 PCT/US99/00248  
(87) 国際公開番号 WO99/35289  
(87) 国際公開日 平成11年7月15日(1999.7.15)  
(31) 優先権主張番号 09/003, 723  
(32) 優先日 平成10年1月7日(1998.1.7)  
(33) 優先権主張国 米国 (US)  
(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), AU, CA, JP, US

(71) 出願人 クローンテック ラボラトリーズ インク.  
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 パロアルト イースト メドウ サークル 1020  
(72) 発明者 チェンシック アレックス  
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 パロアルト サン アントニオ ロード #300 670  
(72) 発明者 シーバート ポール  
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サニーベイル チュラ ビスタ テラス 1005  
(74) 代理人 弁理士 清水 初志 (外1名)  
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 高分子アレイおよび結合アッセイにおけるそれらの使用のための方法

(57) 【要約】

剛性固体支持体の表面と安定的に結合している高分子標的のアレイが提供される。本アレイにおいて、高分子標的は少なくともサイズに従って配列される。本アレイの高分子標的は一般に核酸または蛋白質などの生体高分子であり、リボ核酸または蛋白質が好ましい高分子標的である。本アレイはさまざまな用途に有用であり、高スループット遺伝子発現解析の用途における使用に特に適する。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 剛性固体支持体の表面と安定的に結合している高分子標的の  
アレイであって、該高分子標的がサイズに従って配列されているアレイ。

【請求項2】 高分子標的が核酸である、請求項1記載のアレイ。

【請求項3】 核酸がリボ核酸である、請求項2記載のアレイ。

【請求項4】 リボ核酸がポリA+RNAである、請求項3記載のアレイ。

【請求項5】 高分子標的が蛋白質である、請求項1記載のアレイ。

【請求項6】 高分子標的が表面と共有結合している、請求項1記載のア  
レイ。

【請求項7】 高分子標的が表面と非共有的に結合している、請求項1記載  
のアレイ。

【請求項8】 剛性固体支持体の表面と安定的に結合している核酸のアレイ  
であって、該核酸がサイズに従って配列されているアレイ。

【請求項9】 核酸がリボ核酸である、請求項8記載のアレイ。

【請求項10】 リボ核酸がポリA+RNAである、請求項9記載のアレイ。

【請求項11】 核酸が表面と共有結合している、請求項8記載のアレイ。

【請求項12】 核酸が表面と非共有的に結合している、請求項8記載のア  
レイ。

【請求項13】 剛性固体支持体の表面と安定的に結合している蛋白質のア  
レイであって、該蛋白質がサイズに従って配列されているアレイ。

【請求項14】 蛋白質が天然にみられる蛋白質またはそれらの断片である  
、請求項13記載のアレイ。

【請求項15】 蛋白質が表面と共有結合している、請求項14記載のアレイ  
。

【請求項16】 蛋白質が表面と非共有的に結合している、請求項14記載の  
アレイ。

【請求項17】 プローブと標的化合物との間の結合イベントを検出するた  
めの方法であって、

プローブを含む溶液と、高分子標的がサイズに従って配列されている、剛性固

体支持体の表面と安定的に結合している高分子標的のアレイとの接触、および  
少なくとも1つの該高分子標的と該プローブとの間の結合イベントの検出  
を含む方法。

【請求項18】 プローブが標識されており、検出が該標識の存在を検出する  
ことを含む、請求項17記載の方法。

【請求項19】 標識が同位体性、蛍光性および酵素性標識からなる群から  
選択される、請求項18記載の方法。

【請求項20】 方法が検出の前に非結合型プローブを基板から洗い流すこ  
とをさらに含む、請求項17記載の方法。

【請求項21】 結合イベントが特定の結合対 (binding pair) の要素間の  
ものである、請求項17記載の方法。

【請求項22】 要素が蛋白質である、請求項21記載の方法。

【請求項23】 結合イベントが相補的核酸の間のハイブリダイゼーション  
を含む、請求項15記載の方法。

【請求項24】 プローブと標的との間の結合イベントの検出を目的とする  
方法に用いるためのキットであって、

剛性固体支持体の表面と安定的に結合している高分子標的のアレイであって、  
該高分子標的がサイズに従って配列されているアレイ  
を含むキット。

【請求項25】 高分子標的が核酸である、請求項24記載のキット。

【請求項26】 高分子標的が蛋白質である、請求項24記載のキット。

【請求項27】 シグナル発生系の1つまたは複数の要素をさらに含む、請  
求項24記載のキット。

【請求項28】 少なくとも1つの緩衝媒体をさらに含む、請求項24記載の  
キット。

【請求項29】 高分子標的がサイズに従って配列されている、剛性固体支  
持体の表面と安定的に結合している高分子標的のアレイを製造するための方法で  
あって、以下の段階を含む方法：

複数の高分子標的をサイズに従って分離する段階、および

該サイズ分離された高分子標的を剛性固体支持体の表面と安定的に結合させる段階。

【請求項30】 分離が、複数の高分子標的を分離媒体中に導入し、媒体に電場をかけることによって行われる、請求項29記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

結論技術分野

本発明の分野は、生体ポリマーマイクロアレイである。

【0002】

発明の背景

オリゴヌクレオチドのような結合因子の「バイオチップ」またはマイクロアレイは、バイオテクノロジーの産業および関連分野においてますます重要なツールとなっている。これらの結合因子アレイ（これらは、複数の結合因子がアレイまたはパターンの形式で固体支持体表面上に沈着される）は、種々の適用（薬物スクリーニング、オリゴヌクレオチド配列決定などを含む）における用途を見出す。バイオチップの1つの重要な用途は、差次的遺伝子の発現の分析においてであり、ここで異なる細胞における遺伝子（通常、目的の細胞およびコントロール）の発現を比較し、発現におけるいかなる相違も同定される。このようなアッセイでは、相違の存在がいかなる細胞において発現される遺伝子のクラスにおける差異を示す。このような情報は、特定の種類の細胞または組織において発現される遺伝子の種類を同定するために有用であるが、細胞によって発現される個々の遺伝子産物のサイズに関する情報は得られない。

【0003】

このような情報を得るためには、ノーザンブロット法および類似の手法などの標準的なブロット手順に依拠する必要がある。このような手法では、標的化合物の可能性のある複合混合物をまずサイズ分離し、続いて柔軟な支持体に移行させる。続いて、関心対象の化合物を検出するプローブを、サイズ分離された標的と接触させる。陽性のプローブ/標的結合事象が生じた後に、結合型プローブを検出することにより、標的の発現レベル（または存在量）およびサイズに関する情報が得られる。このようなブロット法からサイズの情報を得ることは可能であるが、今日までに用いられている形式は高スループット解析における使用には適していない。

## 【0004】

特定の種類の細胞または組織において発現される遺伝子の種類、発現レベルおよび発現産物のサイズに関する情報は、多くの用途における関心事であるため、両方の種類の情報を高スループット形式で提供しうるアレイ型装置の開発には関心がもたれている。

## 【0005】

関連文献

生体高分子 (biopolymeric) 化合物のアレイおよびそれらの製造のための方法を記載している特許ならびに特許出願には、以下のものが含まれる：第5,242,974号、第5,384,261号、第5,405,783号、第5,412,087号、第5,424,186号、第5,429,807号、第5,436,327号、第5,445,934号、第5,472,672号、第5,527,681号、第5,529,756号、第5,545,531号、第5,554,501号、第5,556,752号、第5,561,071号、第5,599,895号、第5,624,711号、第5,639,603号、第5,658,734号、国際公開公報第93/17126号、国際公開公報第95/11995号、国際公開公報第95/35505号、欧州特許第742287号および欧州特許第799897号。

## 【0006】

種々の用途におけるアレイの使用方を記載している特許および特許出願には以下のものが含まれる：第5,143,854号、第5,288,644号、第5,324,633号、第5,432,049号、第5,470,710号、第5,492,806号、第5,503,980号、第5,510,270号、第5,525,464号、第5,547,839号、第5,580,732号、第5,661,028号、国際公開公報第95/21265号、国際公開公報第96/31622号、国際公開公報第97/10365号、国際公開公報第97/27317号、欧州特許第373203号および欧州特許第785280号。

## 【0007】

アレイに関する形式およびそれらの使用方法を含め、マイクロアレイ技術の概説を行っているその他の文献には、以下のものが含まれる：ロックハート (Lockhart) ら、Nature Biotechnology (December 1996) 14 : 1675。

## 【0008】

クローンテック (Clontech) 社のカタログ、97/98 (Clontech Laboratories, Inc. 1020 East Meadow Circle, Palo Alto CA 94303) p.81には、あらかじめ作

製されたノーザンブロットが記載されている。

【0009】

#### 発明の概要

剛性支持体の表面に安定的に結合している高分子標的のアレイが提供される。本アレイにおいて、高分子標的は少なくとも標的のサイズに従って配列される。高分子標的は一般に核酸または蛋白質などの生体高分子化合物であり、好ましくはリボ核酸または蛋白質である。本アレイはさまざまな用途に有用であり、高スループット遺伝子発現解析の用途における使用に特に適する。

【0010】

#### 定義

本明細書で用いる「ペプチド」という用語は、1つのアミノ酸のカルボキシル基ともう1つの基のアミノ基との間のアミド形成によって生じる任意の化合物を意味する。

【0011】

本明細書で用いる「オリゴペプチド」という用語は、残基、すなわちアミノ酸単量体の単位にして約10～20残基のペプチドを意味する。

【0012】

本明細書で用いる「ポリペプチド」という用語は、10～20残基を上回るペプチドを意味する。

【0013】

本明細書で用いる「蛋白質」という用語は、約50残基を上回る特定の配列のポリペプチドを意味する。

【0014】

本明細書で用いる「核酸」という用語は、ヌクレオチド(例えば、デオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドで構成されるポリマーを意味する。

【0015】

本明細書で用いる「リボ核酸」および「RNA」という用語は、リボヌクレオチドで構成されるポリマーを意味する。

【0016】

本明細書で用いる「デオキシリボ核酸」および「DNA」という用語は、デオキシリボヌクレオチドで構成されるポリマーを意味する。

【0017】

本明細書で用いる「オリゴヌクレオチド」という用語は、約10～100ヌクレオチド長の一本鎖ヌクレオチドマルチマーを示す。

【0018】

本明細書で用いる「ポリヌクレオチド」という用語は、一般的に約100ヌクレオチド長よりも大きいヌクレオチドモノマーで構成される一本鎖または二本鎖のポリマーをいう。

【0019】

特定の態様の説明

アレイの高分子標的が少なくともサイズに関して配列されている、剛性支持体上の高分子標的のアレイが提供される。高分子標的は典型的には、核酸または蛋白質などの生体高分子である。好ましい態様において、高分子標的はリボ核酸または蛋白質のいずれかである。本アレイはさまざまな用途に有用であり、高スループット遺伝子発現解析の用途における使用に特に適する。本発明のさらなる説明においては、本発明をまず説明した後に、本アレイの調製の仕方に関する説明、および代表的な結合アッセイ法におけるそれらの使用に関する考察を行う。

【0020】

本発明をさらに記載する前に、本発明が、以下に記載される本発明の特定の実施態様に限定されないことが理解されるべきである。なぜなら、特定の実施態様の変型がなされ、そしてなお添付の特許請求の範囲内にあり得るからである。使用される用語法は、特定の実施態様を記載するための目的のためのものであり、そして限定的であることは意図されないことがまた理解されるべきである。代わりに、本発明の範囲は、添付の特許請求の範囲によって確立される。

【0021】

この明細書および添付の特許請求の範囲において、単数形態の「a」、「an」、および「the」は、文脈が明確に他の様式で示さない限り、複数の言及を含む。他の様式で規定されない限り、本明細書で使用する全ての技術的および科学



的用語は、本発明が属する分野の当業者に一般に理解されている意味と同じ意味を有する。

【0022】

本発明の極めて重要な特徴は、剛性支持体上に少なくともサイズに従って配列された高分子標的のアレイである。本アレイの高分子標的は典型的には生体高分子であり、このことはそれらが天然にみられる高分子化合物であるか、または少なくとも天然にみられる高分子化合物の模倣物 (mimetic) もしくは類似体であることを意味する。特に関心がもたれる生体高分子化合物は、リボ核酸のほか、例えばRNA (2本鎖および1本鎖の両方) から増幅されたcDNA、cDNAライブラリーからのcDNA挿入物などの、逆転写などの種々の過程 (通常は酵素的過程) によって生成されるそのデオキシリボ核酸誘導体、ならびにオリゴペプチド、ポリペプチドおよび蛋白質などのペプチドである。好ましい態様において、高分子標的はリボ核酸または蛋白質である。高分子標的として関心がもたれるリボ核酸には、全RNA、ポリA<sup>+</sup> RNA、ポリA<sup>-</sup> RNA、snRNA (核内低分子)、hnRNA (ヘテロ核)、細胞質RNA、プレmRNA、mRNA、cRNA (相補性) などが含まれる。RNA標的は天然の生物材料、特に哺乳動物材料、より特別にはマウス、ラットまたはヒト材料から入手してもよく、またはそれらに由来するものでもよいが、このような材料には以下のものが含まれる: 胎児全体またはその小区分、例えば胎児脳もしくはその小区分、胎児心臓、胎児腎臓、胎児肝臓、胎児肺、胎児脾臓、胎児胸腺、胎児腸、胎児骨髄などの胎児組織、全脳およびその小区分、例えば扁桃核、尾状核、脳梁、海馬、視床下部、黒質、視床下核、視床、小脳、大腦皮質、延髄、後頭極、前頭葉、側頭葉、被殻、副腎皮質、副腎髓質、中隔側坐核、下垂体など、副腎ならびに副腎皮質および副腎髓質などのその小区分、大動脈、虫垂、膀胱、骨髄、結腸、粘膜を含まない結腸基部、心臓、腎臓、肺、リンパ節、乳腺、卵巢、脾臓、末梢血白血球、胎盤、前立腺、網膜、唾液腺、小腸、骨格筋、皮膚、脊髓、脾臓、胃、精巣、胸腺、甲状腺、気管、子宮、子宮内膜を含まない子宮などの成体組織、乳癌T-47D、大腸腺癌SW480、ヒーラ (HeLa)、慢性骨髓性白血病K-562、リンパ芽球性白血病MOLT-4、前骨髓球性白血病HL-60、肺癌A549、パーキットリンパ腫ダウディ (Daudi)、パーキットリンパ腫ラジ (Raji)、悪性黒色腫G361

、奇形癌PA-1、白血病ジャーカット (Jurkat) などの細胞系などが含まれる。高分子標的として関心がもたれる蛋白質には、天然にみられる蛋白質またはその断片、例えば全細胞もしくは組織抽出物、その特定の画分、例えば細胞質蛋白質、核蛋白質、細胞外蛋白質などの抽出物などが含まれ、このような蛋白質には以下のものが含まれる：抗体、受容体、ホルモンなど。標的が上記の哺乳動物材料などの天然の材料に由来する場合には、標的は同じ生物体または異なる生物体のいずれに由来してもよいが、通常は同じ生物体に由来するものと考えられる。さらに、プレート上に配列される標的試料は、正常な状態、ならびに癌、脳卒中、心不全、老化、感染症、炎症、毒物、薬物もしくは他の作用物質への曝露、熱ショック、断眠、身体活動などの条件的処理、種々の発育段階などの罹患または条件的状態にある同じ生物体に由来しうる。

#### 【0023】

1つの好ましい態様において、標的は全RNAまたはポリA<sup>+</sup> RNAである。

#### 【0024】

RNAなどの標的は、存在量が比較的多い場合にはその材料から直接用いてもよく、稀な組織からのRNAのように比較的稀な場合などには必要であればPCR転写またはクローニング法などによって増幅してもよい。

#### 【0025】

本アレイにおいて、標的は剛性支持体の表面と安定的に結合している。安定的に結合しているとは、ハイブリダイゼーションおよび洗浄条件下で、標的が剛性支持体に対してその位置を保つことを意味する。このため、標的は剛性支持体の表面と非共有的または共有的に結合しうる。非共有結合の例には、ハイブリダイゼーションなどの結合が起こるために十分な様式で標的が提示される、非特異的吸着、支持体表面と共有的に結びついた特異的結合対の要素との特異的結合、および水和もしくは乾燥した分離用媒体などの基質材料中への捕捉が含まれる。共有結合の例には、標的と剛性支持体の表面上に存在する官能基（例えば、-OH）との間で形成された共有結合が含まれる。ここで、官能基は、以下により詳細に記載するように、天然に存在するか、または導入された連結基のメンバーとして存在し得る。

## 【0026】

上記のように、アレイは、剛性基板 (rigid substrate) 上に存在する。剛性とは、支持体が固体で容易に折り曲げられない、すなわち支持体が可変性でないことを意味する。本発明に関して剛性ではない固体支持体である固体材料の例には、膜、可変性のプラスチックフィルムなどが含まれる。そのような場合、本発明のアレイの剛性基板は、アレイが使用されるアッセイ条件下で、特に高処理量条件下で、その上に存在するポリマー性の標的に対して物理的な支持体および構造体を提供するのに十分である。

## 【0027】

本発明の標的パターンが本発明のアレイ中に提示される剛性支持体は、簡単なものから複雑なものまで、アレイの意図される使用に依存して、種々の立体配置を取り得る。したがって、基板は、長方形または円板形の構造 (configuration) などの全体的にスライド状またはプレート状の構造をとることができるが、標準的なマイクロタイタープレートおよび顕微鏡用スライドに認められるような全体的に長方形の構造が好ましい。一般に、合成基板の長さは少なくとも約1cmであり、40cmまたはそれ以上であってもよいが、通常は約30cmを上回ることはなく、約15cmを上回らないことがしばしばであると思われる。剛性基板の幅は一般に少なくとも約1cmであり、30cmでもよいが、通常は20cmを上回ることはなく、10cmを上回らないことがしばしばであると思われる。合成基板の高さは一般に0.01mmから10mmの範囲であり、これは少なくとも一部には合成基板が製造される材料、および必要な剛性を得るために必要な材料の厚さに依存する。

## 【0028】

本発明のアレイの剛性基板は、種々の材料から製造され得る。基板が製造される材料は、ハイブリダイゼーション事象または特異的結合事象の間にプローブと低いレベルの非特異的結合を示すことが理想的である。多くの状況において、可視光および/またはUV光に対して透明である材料を利用することがまた好ましい。目的の特定の材料には、ガラス、プラスチック (例えば、ポリテトラフルオロエチレン、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリカーボネート、およびこれらのブレンドなど)、金属 (例えば、金、プラチナなど) などが含まれる。

## 【0029】

本発明のアレイの剛性基板は、標的分子のパターンが存在する少なくとも1つの表面を含む。そこでは、表面は滑らかであるか、実質的に平坦であり得、または陥没もしくは隆起のような不規則性を有し得る。標的のパターンが存在する表面は所望の様式で表面の特性を改変するために作用する1つ以上の異なる化合物の層によって改変され得る。このような改変層は、存在する場合には、一般に厚さが1分子の厚み～約1mmまでの範囲であり、通常1分子の厚み～約0.1mm、そしてより通常には、1分子の厚み～0.001mmの範囲である。目的の層の改変には、金属、金属化合物、ポリマー、低有機分子などのような無機および有機層が含まれる。目的のポリマー層には、ペプチド、蛋白質、ポリ核酸、またはそれらの模倣物（例えば、ペプチド核酸など）；ポリサッカライド、リン脂質、ポリウレタン、ポリエステル、ポリカーボネート、ポリウレア、ポリアミド、ポリエチレンジアミン、ポリアリレンスルフィド、ポリシロキサン、ポリイミド、ポリアセテートなどの層が含まれ、ここでポリマーは、ヘテロまたはホモポリマーであり得、そしてそれに付着した（例えば、結合体化した）別個の機能性部分を有しても、有さなくてもよい。

## 【0030】

支持体表面上の標的位置の濃度は、種々の異なる標識を有するプローブとの結合イベントに十分な感度が得られるように選択され、濃度は一般に約1～100ng/mm<sup>2</sup>、通常は約5～50ng/mm<sup>2</sup>、より一般的には約10～30ng/mm<sup>2</sup>の範囲である。上記に概要を述べた通り、本アレイは複数の異なる高分子標的を含み、標的の数は少なくとも5個、通常は少なくとも8個であり、さらに多くてもよい。いくつかの態様において、アレイには少なくとも10個の異なるスポット、通常は約20個の異なるスポット、より一般的には少なくとも約50個の異なるスポットがあり、スポットの数は10,000個またはそれ以上でもよいが、通常は異なるスポットが約5,000個を上回ることではなく、より一般的には異なるスポットが約3,000個を上回ることはないと考えられる。いくつかの特定の態様において、固体表面上のスポットの密度は少なくとも約5個/cm<sup>2</sup>、通常は少なくとも約10個/cm<sup>2</sup>であるが、約1000個/cm<sup>2</sup>を上回ることではなく、通常は約500/cm<sup>2</sup>を上回ることではなく

、より一般的には約 $300/\text{cm}^2$ を上回ることではない。

#### 【0031】

本アレイの極めて重要な特徴は、アレイの標的要素が少なくともサイズに関して固体支持体の表面上に配列されていることであり、このことは支持体上の標的のパターン構成が少なくともアレイ中の各標的要素のサイズを反映することを意味する。サイズに従った配列に関して、標的はサイズに関して連続的または非連続的な形式で配列されうると考えられる。連続的とは、アレイ中の標的のパターンにおいて、パターンがレーン状の構造をもつ場合には標的のレーンにおける連続的な位置などであるようなアレイ中の連続した各位置が、同じ分子量の標的分子を含むことを意味する。非連続的形式とは、レーンにおけるバンドなどのパターンにおける各位置が、例えばサイズの範囲が $1 \cdot 10^4 \sim 1.2 \cdot 10^4$  ダルトンにわたる画分というような、本来の材料に由来する標的分子の一定の画分を表すことを意味する。このため、非連続的形式において、パターンにおける各標的位置は本来の試料に由来する標的の一定の画分を含むと考えられ、各画分における標的は、以下に詳細に説明する画分の調製時に決定される範囲内の分子量を有すると考えられる。

#### 【0032】

標的のパターンは、アレイ中の各位置が固有のサイズを表す限りは種々の構造をとることができ、ここでサイズとは、アレイが連続的または非連続的形式のいずれをとるかに応じて、上記の通り、1つの固有の分子量または一定範囲の分子量を意味する。パターンはそれぞれの個々の標的位置が少なくとも1つのレーン、すなわち剛性基板の表面上の線状列となるような形態をとることが好ましいと考えられる。本アレイは基板の表面上に単一のレーンまたは複数のレーンを含むが、複数のレーンが存在する場合には、レーンの数は通常は少なくとも2本であって200本未満、より一般的には5本を上回って100本未満、最も一般的には8本を上回って80本未満であると考えられる。

#### 【0033】

各アレイは、1本または複数のレーンが組織供給源からの全mRNAの大部分を表すような、同一組織などの同一供給源から得られる標的を含んでもよく、同一生

物すなわちマウス、ラットもしくはヒトからの異なる組織、または同一の本来の宿主供給源もしくは異なる宿主供給源から得られた罹患および正常組織からの標的を含んでもよいが、異なる供給源からの標的が提示される場合には、支持体の表面上のレーンなどのそれぞれの個々のパターンは同一供給源からの標的を含む、すなわちパターンはそれらの供給源に関して均質であると考えられる。したがって、このような態様において、剛性基板の表面は、異なる組織などの供給源に由来する標的分子の複数のパターンを提示し、ここでレーンなどの各アレイにおける標的は、上記の通り、連続的または非連続的にサイズに従って配列されると考えられる。図1を参照されたい。図1において、アレイ10は、サイズに従って配列された高分子標的のパターン12がその表面上に提示される固体支持体10からなる。サイズマーカー用レーン14も提示されている。

#### 【0034】

本発明のアレイは、適切な容器中、カバーガラス下などにおけるプローブとの接触などの周知の技術を用いる結合アッセイ法に直接用いてもよく、バイオチップ形式、マルチウェル形式などの、分析の容易さ、高スループットまたはその他の利点をもたらす構造物に組み入れてもよい。例えば、本アレイを、液体の入口部および出口部ならびに実質的に平面である長方形の表面によって上部および底部が囲まれた空間を含む実質的に長方形のカートリッジを有し、上部および底部の表面にアレイが存在するバイオチップ型装置中に組み入れることが可能と考えられる。組み立てられた形態にある代表的なバイオチップ装置を図2および図3に示す。図2において、バイオチップ装置20は、本発明によるアレイが内部に配置される実質的に密閉された槽 (chamber) が提供されるような様式でスパーサー壁28によって隔てられた上部および底部の平面プレート26を含む。試薬入口部22は槽内への試薬の導入をもたらし、出口部24は液体の出口となる。図3は、高分子標的のパターンがサイズに従って配列され、サイズマーカーも存在する、分解された形態を示している。

#### 【0035】

または、本アレイを、アレイが容器の底面であるような反応容器を形成するために十分な様式で各アレイが隆起した壁によって囲まれた高スループットまたは

マルチウェル装置に組み入れることも可能であると思われる。このような高スループット装置は米国特許出願第08/974,298号に記載されており、その開示は参照として本明細書に組み入れられる。このような装置では一般に、装置は複数の反応槽を含み、そのそれぞれは反応槽の底面にアレイを含む。複数は少なくとも2個、通常は4個、より一般的には少なくとも24個を意味し、反応槽の数は96個またはそれ以上であってもよいが、通常は100個を上回ることはないと考えられる。各反応槽の容積は10 $\mu$ l程度でもよいが、通常は500 $\mu$ lを上回ることはないと考えられる。

#### 【0036】

本アレイは以下の通りに調製することができる。剛性基板または支持体は既知の手法に従って製造することができ、支持体の個々の製造手段はそれが製造される材料に必然的に依存する。例えば、高分子材料の場合には、支持体を射出成形することができるが、金属材料の場合に選択される方法は微細加工であると思われる。または、ガラス、合成樹脂または金属シートなどの剛性支持体を種々の市販経路から購入して用いることも可能である。支持体の表面を、標準的な沈着法を用いて、上記の通りに1つまたは複数の表面修飾層を含むように修飾してもよい。

#### 【0037】

精製工程における次の段階は、標的分子のパターンを調製し、続いて、結果として得られたサイズ分離された標的分子を剛性支持体の表面と安定的に結合させることである。標的分子の複合材料は、その天然の生理的供給源から標準的な技法を用いて入手可能である。核酸、蛋白質およびそれらの画分を細胞、組織、臓器および生物体全体から単離するための手順は以下の文献に記載されている：マニアチス (Maniatis) ら、分子クローニング：実験室マニュアル (Molecular Cloning: A Laboratory Manual) (Cold Spring Harbor Press) (1989)、スコープ (Scope R.)、蛋白質精製：原理および実践 (Protein Purification. Principle and Practice) (Springer-Verlag) (1994) およびドイッチャー (Deutscher)、蛋白質精製の手引き (Guide to Protein Purification) (Academic Press) (1990)。このような方法では、本来の生物学的供給源を、1つまたは複数の組

織／細胞ホモジネート化、核酸／蛋白質抽出、クロマトグラフィー、遠心分離、アフィニティー結合などにかけることが典型的である。標的分子の調製に、以下の1つまたは複数が得られるように設計された1つまたは複数の処理を含めることも可能である：標的分子のサイズ分離の改善、剛性支持体の表面とのより安定的な結合、およびハイブリダイゼーションおよび検出の改善。このような処理は調製しようとする標的分子の性質に必然的に依存すると考えられるが、以下のものの1つまたは複数が含まれる：逆転写、ヌクレアーゼ処理、プロテアーゼ消化、インビトロ転写、インビトロ翻訳、DNA増幅、ビオチン、ジゴキシゲニン、蛍光成分、抗原、キレート基、化学活動または光活動基などの官能基（functional moiety）の導入によるRNAまたは蛋白質の酵素的または化学的修飾など。

#### 【0038】

標的分子の複合混合物を調製した後に、混合物をサイズ分離し（サイズ分離は連続的様式でも非連続的様式でもよい）、剛性支持体の表面と安定的に結合させる。標的分子の混合物を連続的様式でサイズ分離するためには、結果として得られる各群の分子が同一の分子量またはサイズを有するように、各成分を重量またはサイズによって実質的に分離するために十分な条件下において標的複合混合物を分離媒体中で電気泳動的に分離する。望ましいサイズ分離を達成するためには好都合な任意の電気泳動法を用いることができ、以下のものを含む線状および架橋高分子ゲル媒体などの種々の適した分離媒体が知られており、利用可能である：ポリアクリルアミドおよびその誘導体、アガロースおよびその誘導体、ポリアクリルアミド／アガロース複合ゲル、ポリ-N-アクリロイル-トリス（poly-N-acryloyl-tris）ゲル、多糖類、ヒドロキシエチルセルロース、ポリ-N,N-ジメチルアクリルアミド、ポリエチレンオキシド、ポリエチレンオキシド-ポリプロピレンオキシドブロック共重合体（例えば、Pluronic(登録商標)という商標名で販売されている）など。

#### 【0039】

分離媒体は、剛性支持体の表面に対して安定的な位置にあるサイズ分離された標的分子を保持するための基質（すなわち、捕捉基質）として好都合に用いられると思われる。このような態様において、サイズ分離は、剛性支持体によって支持



された分離媒体中で行うことができ、分離媒体は剛性支持体の表面と共有的または非共有的に結合していてもよい。もう1つの態様では、サイズ分離を、スパーを介して互いに隔てられた長方形のガラス製プレートなどの剛性平面表面間の空間として囲まれた分離媒体中で行うことができる。このような態様において、サイズ分離された分子を剛性支持体の表面上に保持するための基質として後に役立つ分離媒体はゲルとして維持させても乾燥させてもよいが、ゲルを乾燥させる場合には、ゲルに亀裂が生じないように注意を払う必要がある。このため、捕捉基質が存在する場合、その厚さは一般に約0.01~10mm、通常は約0.05~5mm、より一般的には約0.1~2mmの範囲である。分離媒体（すなわち、捕捉基質）において剛性支持体の表面との安定的な結合が確実に得られるように、当技術分野で知られた方法、すなわち光および／または化学架橋により、標的分子を分離培地の成分と架橋させてもよい。

#### 【0040】

または、分子を連続的様式でサイズ分離し、続いて剛性支持体に移行させてもよい。移行は数多くの異なる様式で実施可能であるが、用いる個々の手順は、標的分子のサイズ分離のために用いる分離法に必然的に依存すると考えられる。サイズ分離された分子を支持体表面に移行させるための方法には以下のものが含まれる：電気泳動、プロット法、受動拡散など。このような態様において、剛性支持体の表面および／または標的分子は、標的分子の沈着パターンと支持体表面との安定的な結合が得られるように、上記の通りに選択または前処理されと考えられる。例えば、共有結合を介して標的分子のパターンを剛性支持体表面と安定的に結合させようとする場合には、適切な官能基（例えば、核酸の場合には-NH<sub>2</sub>）を含む剛性支持体が用いられると考えられる。逆に、特異的結合対の相互作用によって安定的な結合を達成しようとする場合には、適切な特異的結合対の要素、例えばアビジン、ストレプトアビジン、抗体、リガンド、オリゴdTなどが支持体表面に確実に存在するような諸段階が用いられると考えられる。もう1つの態様では、標的分子の官能基と剛性支持体表面に存在する官能基との間の非特異的相互作用（例えば、静電性、疎水性、親水性、水素結合など）によって安定的な結合が達成される。

## 【0041】

非連続的なサイズ分離パターンの場合には、標的分子の最初の複合混合物は、各画分が一定範囲の分子量からなる、すなわち各画分を構成する化合物が一定範囲の分子量に収まるような複数の画分に分離されと考えられ、ここで各画分における範囲の幅は少なくとも $10^3$  ダルトン、通常は少なくとも $2 \cdot 10^3$  ダルトンと考えられ、 $5 \cdot 10^3$  ダルトンまたはそれ以上でもよいが、通常は約 $10^6$  ダルトンを上回ることではなく、より一般的には約 $10^5$  ダルトンを上回ることはないと考えられる。標的分子の最初の複合混合物の分画は任意の好都合な技法を用いて達成しうと考えられ、このような技法には以下のものが含まれる：分離用ゲル、毛細管などを含む電気泳動、サイズ排除、イオン交換、イオン対、疎水性クロマトグラフィーなどの低圧FPLCまたはHPLCクロマトグラフィー、超遠心分離、分子サイズによるFACS分子ソーティングなど。最初の複合混合物から生じる画分の数はいくつか、少なくとも10、通常は20、より一般的には少なくとも30と考えられるが、この数は一般に1000を上回ることはないと考えられ、通常は500を上回ることではなく、より一般的には200を上回ることはないと考えられる。この結果得られる画分は、「インクジェット」装置、機械的沈着、ピペッティング等を用いるなどの任意の好都合な手段を用いて、剛性支持体表面に沈着させることができる。材料を固体表面に沈着させた後には、標的の安定的な結合、非特異的結合部位のブロック、非結合標的の除去などを得るためのさまざまな方法によってそれを処理することができる。パターンが連続的形式に基づくアレイを調製する場合と同じく、剛性支持体表面に位置する標的分子の画分のパターンがそれに対して確実に安定的に結合するような諸段階を用いるが、このような諸段階は上記の通りである。

## 【0042】

標的分子のパターンを支持体表面に安定的に配置した後には、その結果得られるアレイを、種々の結合用途に用いるための上記の通りのバイオチップ、マルチウェル形式もしくはその他の装置として、またはそれに組み入れる形で用いることができる。

## 【0043】

本アレイまたはそれらを内部に組み入れた装置を、後の時点で用いるために製

造後に都合よく保存してもよい。適切な条件下において、本アレイは少なくとも約6カ月間は保存可能であり、最大で1年間またはそれ以上の保存が可能である。本アレイは一般に約 $-20^{\circ}\text{C}$ から室温までの範囲の温度で保存されるが、この場合にはアレイをバッグなどの合成樹脂容器中に密閉し、遮光することが好ましい。

#### 【0044】

本アレイが特に有用な用途は、発現解析の用途である。このような用途は一般に以下の段階を含む：(a) プローブの調製、(b) 例えばハイブリダイゼーションまたは特異的結合などによってプローブが対応する標的と結合するために十分な条件下でのプローブとアレイとの接触、(c) 非結合型プローブのアレイからの除去、および(d) 結合型プローブの検出。これらの段階のそれぞれを以下に詳細に説明する。

#### 【0045】

プローブの調製の方法は、プローブが核酸またはペプチドのいずれであるかというような、プローブの特定の性質に必然的に依存すると考えられる。核酸プローブの場合には、プローブとしては、リボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドのほか、ホスホジエステル結合がホスホロチオエート、メチルイミノ、メチルホスホネート、ホスホロアミダイト、グアニジンなどの代替的結合によって置換された核酸などのそれらのハイブリダイズ性類似体または模倣物、およびリボースサブユニットが置換されたヘキサースホスホジエステル、ペプチド核酸などの核酸、自由度が制限された (locked) 核酸などが可能である。プローブはその標的に対して、望ましいレベルの配列特異的ハイブリダイゼーションが得られるような十分な相補性を有すると考えられる。プローブが核酸である場合にはプローブの長さは一般に約10~2000ntの範囲であると考えられ、オリゴヌクレオチドプローブの長さは一般に約15~100ntの範囲であると考えられ、ポリヌクレオチドプローブの長さは一般に約100~1000ntであると考えられ、このようなプローブは1本鎖でも2本鎖でもよいが、通常は1本鎖であると考えられる。本方法において有用な核酸プローブは、既知の化学的または酵素的合成技術、クローニング手順を用いて合成してもよく、天然の源から入手してもよい。

#### 【0046】

本発明において有用なペプチドプローブには以下のものが含まれる：ポリクローナル性、モノクローナル性およびそれらの結合断片などの抗体、標的に対して高親和性をもつペプチドのほか、それらの類似体および模倣物、リガンド、受容体など。核酸プローブの場合と同じく、ペプチドプローブも天然の源から入手してもよく、利用可能な技術を用いて合成してもよい。

#### 【0047】

一般に、プローブ分子は検出段階において検出が得られるように標識されると考えられる。標識されることによって、このプローブがシグナル生成系のメンバーを含み、従って、直接またはシグナル生成系の1以上のさらなるメンバーとの共同作用を介してのいずれかで検出可能であることを意味する。直接検出可能な標識の例は、そこに組み込まれた（通常は共有結合される）放射性同位体部分および蛍光部分、ヌクレオチド単量体単位（例えば、プライマーのdNTP）のようなプローブ部分、またはプローブ分子と機能的部分で結合し得る、検出可能な標的である光活性誘導体もしくは化学活性誘導体を含む。目的の放射性同位体部分または標識は、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{33}\text{P}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{125}\text{I}$ などを含む。目的の蛍光部分または標識は、クマリンまたはその誘導体、例えば、7-アミノ-4-メチルクマリン、アミノクマリン、ボディピー（Bodipy）色素（例えば、Bodipy FL）、カスケードブルー、フルオレセインおよびその誘導体（例えば、フルオレセインイソチオシアネート）、オレゴングリーン、ローダミン色素（例えば、テキサスレッド、テトラメチルローダミン、エオシンおよびエリスロシン類）、シアニン色素（例えば、Cy3およびCy5）、ランタニドイオンの大環状キレート（例えば、チアゾールオレンジエチジウムヘテロ二量体、T0TAB等のようなquantum dye（登録商標）、蛍光エネルギー遷移元素）などを含む。興味深いことに、「量子・ドット(quantum dot)」のような光散乱によって、ナノメートル大の粒子標識が検出可能である。標識はまた、同一の系の1以上のさらなるメンバーと協調的に作用して検出可能なシグナルを提供するシグナル生成系のメンバーであり得る。このような標識の例は、特異的結合対のメンバー例えば、ビオチン、フルオレセイン、ジゴキシゲニン、抗原、多価カチオン、キレート基などのようなリガンドである。ここで、このメンバーは、シグナル生成系のさらなるメンバーに特異的に結合し、ここで

さらなるメンバーは、直接または間接（例えば、アルカリフォスファターゼ結合抗体のような蛍光部分または基質を発色産物へと変換し得る酵素部分に結合体化された抗体）のいずれかで検出可能なシグナルを提供する。関心対象のこのほかの標識には、それに結合したプローブが標的分子と特異的に結合した場合のみシグナルを発するものが含まれ、このような標識には以下のものが含まれる：チャギ（Tyagi）およびクレーマー（Kramer）、Nature Biotechnology（1996）14：303ならびに欧州特許第0 070 685 B1号に記載された「分子的ビーコン（molecular beacon）」。関心対象のその他の標識には、米国特許第5,563,037号、国際公開公報第97/17471号および国際公開公報第97/17076号に記載されたものが含まれる。

#### 【0048】

本方法における次の段階は、プローブとアレイの標的との間に結合が生じるために十分な条件下でプローブをアレイと接触させることである。例えば、プローブおよび標的が核酸である場合には、プローブと標的との間にハイブリダイゼーションが生じるために十分な条件下でプローブがアレイと接触されと考えられ、このハイブリダイゼーション条件は望ましいハイブリダイゼーション特異性が得られるように選択されと考えられる。ペプチドプローブの場合には、プローブとその標的との間に特異的結合が得られるように条件が選択されと考えられる。

#### 【0049】

アレイおよびプローブの接触には、プローブを、プローブを含む水性媒体と接触させる段階が含まれる。接触は、アレイの個々の構造に応じてさまざまに異なるやり方で達成することができる。例えば、アレイが「平板様の（plate-like）」剛性基板の表面上にサイズ分離された標的のパターンを単に含むだけである場合には、接触は、プローブ溶液を含むポリエチレンバッグ、小さな槽などの容器中にアレイを単に配置するだけで達成しうる。アレイが2つの剛性プレートによって囲まれた分離媒体中に捕捉されるその他の態様においては、電気泳動的な手段を介してプローブを送達するという可能性がある。または、液体入口部および出口部を有するバイオチップ装置中にアレイが組み入れられる場合には、標的の

子のパターンが入口部を通じて提示される槽内にプローブ溶液を導入することができ、この場合に液体の導入は徒手的に行っても自動化装置を用いてもよい。マルチウェルの態様においては、プローブ溶液は、ピペットなどを用いて徒手的に、または自動化液体取り扱い装置を用いて、アレイを含む反応槽に導入されると考えられる。

#### 【0050】

プローブ溶液および標的の接触は、プローブと標的との間の結合が生じるために十分な期間にわたって維持されると考えられる。プローブおよび標的の性質によって異なるものの、接触は一般に約10分から24時間まで、通常は約30分から12時間まで、より一般的には約1時間から6時間までの範囲の期間にわたって維持されると考えられる。

#### 【0051】

プローブおよび標的が結合した後は、その結果生じた標識プローブのハイブリダイゼーションパターンを種々のやり方で可視化または検出することができ、検出の個々の様式は核酸の個々の標識に基づいて選択されるが、代表的な検出法にはシンチレーション計数、オートラジオグラフィー、蛍光測定、比色測定、発光測定などが含まれる。

#### 【0052】

本方法は、プローブに用いる個々の標識に応じて、検出段階の前に非結合型標識の除去段階をさらに含んでもよく、含まなくともよい。例えば、均質なアッセイ形式において、検出可能なシグナルはプローブが標識と特異的に結合した場合にのみ生じる。このため、均質なアッセイ形式では、非結合型標識の除去の段階を行わずにハイブリダイゼーションパターンを検出しうる。その他の態様において、用いられる標識はプローブがその標的と特異的に結合しても結合しなくてもシグナルを発すると考えられる。このような態様では、非結合型プローブは支持体表面から除去される。非結合型プローブを除去する1つの手段は周知の洗浄法を行うことであり、種々の洗浄溶液および非結合型プローブの除去に用いるための手順を当業者は知っており、用いることができる。または、媒体に電場をかけるために適した形式で標的が分離媒体中に捕捉されているような状況では、電気

泳動的な手段によって非結合型プローブを標的から除去するという可能性が生まれる。

【0053】

多重解析 (multiplex analysis) が行えるように上記の方法を変更することもできる。例えば、異なる発蛍光団などによってそれぞれを区別しうる標識がなされた複数の異なるプローブ分子を用いることが可能である。

【0054】

上記のアッセイ法は、プローブが結合した標的の発現レベルおよびサイズの両方を同時に決定するために用いる。分析しようとする特定の組織における標的の発現レベルは、検出されたシグナルの強度から導き出せる。正確な発現レベルを確実に導き出すことを目的として、検出されたプローブシグナルの補正のための対照シグナルレベルを得るために、上記の多重手法などを用いて、発現レベルが既知であるハウスキーピング遺伝子をともに検出することが可能である。アレイの標的分子のパターンはサイズに従って配列されているため、プローブが結合し、後にプローブが検出されるパターン内の位置から、標的分子のサイズに関する情報が得られる。

【0055】

さらに別の態様においては、RNAに由来するプローブを第1の標識によって標識し、続いてサイズマーカーに対して相補的なプローブと混合し、第2の標識によって標識する。続いてプローブ混合物をアレイとハイブリダイズさせ、標的およびサイズプローブからのシグナルを用いて、標的サイズの算出または決定を行う。

【0056】

このため、本アレイは、腫瘍性および正常組織などの罹患および正常組織、異なる組織またはサブタイプ、疾患に対する要因、年齢、病原体もしくは毒性物質への曝露のような異なる条件状況下にある組織および細胞などの示差的 (differential) 発現解析を含む、さまざまな遺伝子発現解析の用途に有用である。

【0057】

本アレイを用いる結合アッセイ法を行うためのキットも提供されるが、示差的

遺伝子発現解析アッセイ法を行うためのキットが好ましい。本発明によるこのようなキットは少なくとも本発明によるアレイを含むと考えられ、アレイは剛性平坦支持体上に標的分子のパターンを単に含むだけでもよく、マルチウェル構造物、バイオチップ構造物またはその他の構造物に組み入れてもよい。本キットは、アレイを用いて行おうとするアッセイ法に用いるための1つまたは複数の付加的な試薬をさらに含んでもよく、このような試薬には以下のものが含まれる：緩衝液、プライマー、酵素、標識などのプローブ生成試薬、結合段階に用いるハイブリダイゼーション緩衝液などの試薬、基質、蛍光-抗体結合物などのシグナル発生系の要素など。

#### 【0058】

最後に、本アレイを組み入れたシステム、特に本アレイのバイオチップおよびマルチウェル構造物が提供されるが、本システムは組織中の遺伝子の発現レベルおよびサイズに関する情報が求められる高スループット遺伝子発現解析において有用である。「システム」という用語は、列挙されるその構成要素の作動性結合体（working combination）を意味し、その構成要素には以下に列挙するような構成要素が含まれる。本発明のシステムは一般に、アレイ、プローブ液およびすべての試薬をアレイ上の標的分子のパターンと接触させ、洗浄液をアレイ表面に送達し、そこから除去することが可能な液体取り扱い装置、陽性のプローブ標的結合イベントの位置およびこのような結合イベントによって生じるシグナルの強度の同定を可能とする読み取り装置（reader）のほか、好ましくはシステムの種々の要素の作用、すなわち読み取り装置を起動させる時点、液体を導入する時点などを制御するコンピュータ装置を含む。

#### 【0059】

以下の実施例は例示のためのものであり、制限を目的としたものではない。

#### 【0060】

### 実験

#### 実施例1. 連続的RNAチップの作製および使用

##### A. ゲル調製および電気泳動

以下に提示する実施例は、本発明によるRNAチップの作製のためのマクロフォ



ア (Macrophor) シークエンシングシステムの使用を説明したものである。しかし、その他の任意の垂直または水平ゲル電気泳動装置の組み合わせを用いて、本発明によるアレイを作製することも可能である。

#### 【0061】

まず、バインド-シラン (Bind-Silane) 溶液 (無水エタノール20ml、10%酢酸5mlおよび $\gamma$ -メタクリロキシ-プロピル-トリメトキシシラン75 $\mu$ lの混合物) (Bind-Silane, Pharmacia) 5mlを、繊維非放出性薄織物 (lint-free tissue) を用いて、切れ目入りのプレートの上面に均等に広げる。プレートを2分間乾燥させた後、新しい繊維非放出性薄織物を用いて磨く。プレートをエタノールですすぎ、まだ湿っているうちにプレートを別の薄織物で磨いて乾燥させる。繊維非放出性薄織物を用いて、レペル-シラン (Repel-Silane) 溶液 (Pharmacia) 5mlを自動温度調節プレートの上面全体に広げ、5分間乾燥させる。新しい繊維非放出性薄織物でプレートを磨く。次にレペル-シラン処理を繰り返す。2回目の研磨後にプレートをエタノールですすぎ、まだ湿っているうちにプレートをもう1回磨く。

#### 【0062】

続いてゲル溶液100mlを調製する。ゲル溶液を調製するためには、尿素42g、7.5mlの40%アクリルアミド (38%w/vアクリルアミド、2%w/v N,N'-メチレンビスアクリルアミド)、10mlの10 $\times$ TBE緩衝液 (1M Tris-ホウ酸、10mM EDTA、pH 8.3) を混ぜ合わせる (3%アクリルアミド溶液の代わりに3~5%のハイドロリンク (HydroLink) ゲル (N,N'-ジメチルアクリルアミド/エチレングリコールジメタクリレート、AT Biochem) を用いることもできる)。これに蒸留水を加えて99.2mlに調整する。尿素を溶解し、孔径0.45 $\mu$ mの膜を通して濾過する。続いて、10%過硫酸アンモニウム溶液0.8mlおよびTEMED 90 $\mu$ lを混合物に添加する。

#### 【0063】

続いて、レペル-シラン処理を行った面が上向きになるように、混合物をマクロモールド (MacroMould) (Pharmacia) 上の自動温度調節プレート上に置く。クランプを用いて0.4mmのスペーサーを配置する。切れ目入りガラスプレートを、切れ目が支持体表面の対側になるように置く。続いてゲル溶液を切れ目入りガ

ラスプレートのすぐ手前に注ぎ入れ、勾配をさか上るように滑り込ませる。切れ目が下方のプレートの上端から1cmの位置にきた時点でガラスプレートを一緒にクランプ固定して、コーム (comb) を挿入し、コーム用クランプを固定し、1時間にわたり重合を進行させる。

#### 【0064】

アレイを調製するためには、コーム用クランプおよびコームを除去してウェルを洗浄し、ガラスプレート集成体をマクロフォア (Macrophor) ユニット中に設置する。緩衝液容器を1×TBE緩衝液で満たし、50℃で「前泳動 (pre-run)」を1時間行う。各試料調製物に関して1mg/mlポリA+RNA 1μlを10M尿素1μlおよび10×TBE緩衝液0.1μlと混合して70℃に2分間加熱し、ウェルに充填する。ゲルを10~20v/cmで2時間泳動させる。泳動が終了した時点で切れ目入りプレートをそれに付着したゲルとともに自動温度調整プレートから除去し、120mJに設定したストラタリンカー (Stratalinker) (Stratagene) 中で紫外照射によってゲル中でRNAを架橋させる。ゲルを蒸留水中で5分間洗浄し、65℃のインキュベーターに入れて真空下で1時間乾燥させる。ゲルが固定されたガラスプレートは、ハイブリダイゼーションアッセイのために直接用いることもでき、図2または3に示されたようなバイオチップ装置中に組み入れることもできる。

#### 【0065】

##### B. Cy3-dCTPによるDNAプローブの標識

標識されたDNAプローブの調製には以下の手順を用いる。滅菌した微量遠心管内の蒸留水に2本鎖DNAプローブ25ngを添加し、最終容積を22μlとする。2回のハイブリダイゼーション用にプローブを調製する場合には、反応混合物にDNAを50ng添加することが可能である。続いて5×ランダムヘキサマープライマー溶液 (0.5μg/μl (dN)<sub>6</sub>) 10mlを添加し、その後に混合する。この結果得られる混合物を95~100℃に5分間加熱し、続いて氷上に置く。濃縮によって生じる液滴を回収するために、この混合物を室温で短時間遠心する。続いて以下の成分を混合物に添加する: (1) 10×反応緩衝液 (0.4M Tris-HCl (pH 7.5)、0.1M MgCl<sub>2</sub>、50mM DTT、1mg/ml BSA) 5μl、(2) dATP (0.5mM)、dTTP (0.5mM) およびdCTP (0.5mM) 各2μl、(3) dCTP (0.5mM) 0.5μl、(4) Cy3-dCTP (0.5mM) (Amersham

) 0.5  $\mu$ l、ならびに (5) [ $\alpha$ - $^{32}$ P] dCTP 1  $\mu$ l。次にT7 DNAポリメラーゼ (1u /  $\mu$ l) 2  $\mu$ lを反応混合物に添加する。続いて混合物を37℃で20分間インキュベートする。続いて10×停止溶液 (0.1M EDTA、1mg/mlグリコーゲン) 5  $\mu$ lを添加して反応を終了させる。

#### 【0066】

#### C. カラムクロマトグラフィーによるCy3標識プローブの精製

Cy3で標識されたDNAを、取り込まれていないCy3標識ヌクレオチドおよび小さな (<0.1kb) cDNA断片から精製するためには、以下の手順を用いる。CHROMA SP 1N-200カラム (CLONTECH) を冷凍庫から取り出し、約1時間かけて室温にする。カラムの底の蓋を取った後、上部の蓋を取り除く。続いてカラムを容量1.5mlの微量遠心管に入れる。カラム基質中のゲルビーズの表面が視認できるようになるまで、重力によってカラムから水を排出させる。回収した水は捨てる。次に、試料をゲルベッドの平坦表面の中央部に注ぎ、樹脂ベッドに完全に吸着させる。続いてddH<sub>2</sub>O 25  $\mu$ lを注ぎ、樹脂ベッドの上部に液体が全く残らなくなるまでカラムから完全に排水させる。続いてカラムを清浄な容量1.5mlの微量遠心管に移す。第1画分を回収するために、ddH<sub>2</sub>O 100  $\mu$ lをカラムに添加し、カラムから完全に排水させる。第2、第3および第4画分も同じ様式で回収する。画分1~4が入った管をシンチレーション計数管に入れ、トリチウムチャンネルにおける計数によって各画分に関するチェレンコフ数を計測する。チェレンコフ数が最も高い画分 (通常は画分2~3) をプールする。

#### 【0067】

#### 段階D. Cy3標識DNAプローブのRNAチップとのハイブリダイゼーション

ExpressHyb (CLONTECH) および破碎 (sheared) サケ精巢DNA (Sigma) の溶液を以下の通りに調製する。まず、ExpressHyb 10mlを50~60℃に予熱しておく。破碎サケ精巢DNA 1mgを95~100℃で5分間加熱した後、氷上で急速冷却する。続いて、熱変性した破碎サケ精巢DNAを予熱しておいたExpressHybと混合する。この結果得られる溶液の5mlをRNAチップの内槽 (例えば図2および3参照) に導入し、68℃で30分間プレハイブリダイゼーションを行わせる。Cy3標識DNAプローブ (段階C、約200  $\mu$ l) を、95℃で2分間変性させた5  $\mu$ l (1  $\mu$ g /  $\mu$ l) のヒトCot-1 D

NAと混合した後、氷上で冷却する。この結果得られる混合物をExpressHyb/サケ精巢DNA溶液5mlに添加し、十分に混合してハイブリダイゼーション溶液を作製する。続いて、RNAチップ中のプレハイブリダイゼーション溶液をハイブリダイゼーション溶液と交換する。ハイブリダイゼーションは68℃で一晩進行させる。続いてハイブリダイゼーション溶液を除去し、適切な容器中に廃棄する。洗浄溶液1 (2×SSC、1%SDS) を含む瓶を68℃に予熱し、ペリスタポンプ (peristaltic pump)、RNAチップの入口部、RNAチップの出口部および廃液瓶をすべてポリエチレン管で連結する。RNAチップの内槽を、予熱した洗浄溶液1 (2×SSC、1%SDS) 200mlにより、流速約5ml/分で洗浄する。68℃に予熱した洗浄溶液2 (0.1×SSC、0.5%SDS) 100mlにより、さらに洗浄する。続いてRNAチップをフルオロイメジャー (Fluoroimager) (Molecular Dynamics) 中でのスキャンにかけ、Cy 3標識プローブとRNAチップの表面上に安定的に結合したRNA標的とのハイブリダイゼーションのパターンを得る。

【0068】

実施例2. 非連続的RNAチップの作製およびハイブリダイゼーションにおける使用

段階A. 高速液体クロマトグラフィー (RP-IP HPLC) によるRNAの分離

逆相イオン対高速液体クロマトグラフィー (RP-IP HPLC) によるポリA+RNAのサイズ分画は以下の通りに行う：ポリA+RNA 1mgをDNASepカラム (Serasep Inc, San Jose; Transgenomics) 中に注入し、BioCAD700E灌流クロマトグラフィー用ワークステーション (PerSeptive Biosystem, Framington) を用いて、0.1Mトリメチルアンモニウムイオンを含む5%～80%アセトニトリルの線状勾配にて分離する。RNAのサイズで200ヌクレオチドから約12,000ヌクレオチドに対応し、各画分におけるRNAの平均サイズの差が約100～200ヌクレオチドである100個のポリA+RNA画分を回収し、真空下で乾燥させた後に変性緩衝液 (0.1MOPS (pH 7.0)、1mM EDTA、20%ホルムアルデヒドおよび50%ホルムアミド) 20μl中に溶解させる。

【0069】

段階B. RNAチップの表面上へのRNA画分の固定

段階Aで得られたRNA画分を384穴プレートに移し、65℃で20分間インキュベ-

トした後に、384ピンツール (pin tool) およびBiomek 2000 (Beckman) ロボットを用いてガラスプレート上に載せる。各ポリA+RNAの200画分のそれぞれを、ゲル電気泳動の経過中に生じるRNAのサイズ分布を模したレーン形式において連続的な順序で適用する。これと平行してRNAサイズマーカーを別のレーンに適用し、これにより、ハイブリダイゼーションアッセイ法で明らかになるRNAサイズを後に決定できるようにする。固定されたRNAを、120mJに設定したストラタリンカー (Stratalinker) (Stratagene) 中でのUV照射によって支持体と架橋させ、プレートを蒸留水で5分間洗浄し、65℃のインキュベーター中にて真空下で1時間乾燥させる。RNA画分を伴うガラスプレートは、ハイブリダイゼーションアッセイのために直接用いることもでき、図2または3に示されたようなバイオチップ装置中に組み入れることもできる。続いて、RNAチップは上記の通りにハイブリダイゼーションアッセイ法において用いる。

【0070】

### 実施例3. RNAチップの調製および使用

#### A. 固体支持体上へのポリA+RNAの点状配置 (pin spotting)

##### A.1 ドットプロット形式

通常8個から100個までの範囲の一組のさまざまなポリA+RNAを、固体ガラス支持体上に点状に配置する。ポリA+RNAは共有結合によってガラス表面と安定的に結合する。核酸、すなわちDNAまたはRNAをガラスに付着させるためには、いくつかの方法を用いる。例えば、アミノプロピルシランとの反応により、脂肪族アミノ基がスライドガラスの表面に導入される。続いて、10Mイソチオシアン酸ナトリウム (NaNCS) 溶液 (1:1) で前処理したポリA+RNAを、Biomek 2000 (Beckman) ロボットにより、アミノプロピルで修飾したガラス表面上に点状に配置する。結合はアミノ反応性フェニルイソチオシアネート基によって生じる。ガラス支持体の表面との安定的な結合がさらに確実に得られるように、ポリA+ RNAを光架橋させる。さらに、スライドガラスを80℃で2時間インキュベートする。または、アミノ基をアミノ反応性フェニルイソチオシアネート基に変換するために、アミノ誘導体化を行ったガラス表面にp-フェニレンジイソチオシアネート (PDC) を結合させる。続いて、表面結合型のDNAまたはRNAを得るために、核酸をその

アミノ基およびPDC中の第2のイソチオシアネート基と反応させる。反応は0.5M炭酸ナトリウム緩衝液、pH 9.1中で行う。UV架橋の後に、アミノプロピル修飾またはPDC修飾を行ったスライドガラスを95℃のddH<sub>2</sub>Oで5分間洗浄する。ハイブリダイゼーション後のバックグラウンドシグナルを避けるために、100mMグリシン溶液でスライドガラスを15分間ブロックする。続いてスライドガラスをddH<sub>2</sub>Oおよびエタノールですすぐ。37℃で15分間インキュベートすると、スライドをハイブリダイゼーション実験に用いる準備が整う。

【0071】

#### A.2 マイクロノーザン形式

異なる手法を用いる変性高速液体クロマトグラフィー (DHPLC) により、ポリA+mRNAをサイズ分画する：(i) 逆相イオン対HPLC (RP-IP HPLC) (DNASep, Transgenomics, San Jose) および (ii) 陰イオン交換HPLC (G-DNA-PW, TosoHaas)。トランスゲノミクス (Transgenomics) WAVE HPLCシステムを用いてポリA+RNA 1mgを分離する。RP-IP HPLCには、トリエチルアンモニウムアセテート (TEAA)、トリメチルアンモニウムアセテート (TMAA)、テトラメチルアンモニウムブロミド (TMAB)、テトラエチルアンモニウムブロミド (TEAB)、テトラプロピルアンモニウムブロミド (TPAB)、テトラブチルアンモニウムブロミド (TBAB) などの異なるイオン対溶媒を用いる。TEAA中でイソクラティック (isocratic) アセトニトリル勾配 (16~17%) を用いることにより、50~3,000ヌクレオチドのポリA+mRNAを分画しうる。これよりも長い3,000~12,000ヌクレオチドのRNAは、変性陰イオン交換クロマトグラフィーによって分離される。RNAは65℃で15分間インキュベートすることによって変性する。分画は、20mM Tris/HCl緩衝液、pH 8.0中で、0.5~0.75M塩化ナトリウム (NaCl) または0.17~0.26M酢酸ナトリウム (NaAc) による30分間の線状勾配を用いて行う。流速は1.0ml/分とする。カラム温度は60℃とする。または、マニアチス (Maniatis) らに記載された通りに、結合の前にRNAをグリオキサールで化学変性させる。この場合には、10mM 3-モルホリノプロパンスルホン酸 (MOPS) 緩衝液、pH 7.8を用いる。平均サイズの差が約100~200ヌクレオチドである50~100のRNA画分を回収し、エタノールで沈殿させた後に真空下で乾燥させ、RNアーゼを含まない水に溶解させる。アミノプロピ

ルで修飾したガラス支持体の場合には、RNAを5Mイソチオシアン酸ナトリウム (NaNCs) 溶液で前処理し、A.1に記載した通りに固体支持体上に点状に配置する。PDCで修飾したガラス支持体の場合には、A.1に記載した通りに、RNAを0.5M炭酸ナトリウム、pH 9.1とともにブレインキュベートする。

#### 【0072】

##### B. DNAプローブの標識

DNAプローブとして用いる選択された遺伝子のそれぞれに対して、長さ20~40塩基対のオリゴヌクレオチドプライマーを設計する。PCR反応を行って200~800bpのcDNAプローブを増幅する。cDNAには、クローンテック (CLONTECH) 社のユーザーズマニュアルの標準的手順、Clontech Laboratories Inc., Palo Alto, CAに記載されている通りに [ $^{32}$ P] dATPまたは [ $^{32}$ P] dCTPによる放射性標識を行う。または、蛍光マーカー、またはビオチンと結合させた (光散乱による検出のため) 金、銀などの金属粒子 (Genicon, San Diego, CAから入手可能) のいずれかによってcDNAに非放射性標識を行う。

#### 【0073】

蛍光標識DNAプローブは以下の通りに調製する。2本鎖DNAプローブ25ngをddH<sub>2</sub>O中に溶解して最終容積を22 $\mu$ lとする。ランダムヘキサマープライマー溶液 (0.5 $\mu$ g/ $\mu$ l) 10 $\mu$ lを添加した後に混合する。この結果得られる混合物を95~100 $^{\circ}$ Cに5分間加熱した後、氷上に置く。この結果得られる混合物に以下の成分を添加する: 10 $\times$ 反応緩衝液 (0.4M Tris-HCl, pH 7.5, 0.1M MgCl<sub>2</sub>, 50mM DTT, 1mg/ml BSA) 5 $\mu$ l, dATP (0.5mM), dTTP (0.5mM) およびdCTP (0.5mM) 各2 $\mu$ l, dCTP (0.5mM) 0.5 $\mu$ l, Cy3-dCTP (0.5mM) またはCy5-dCTP (Amersham) 0.5 $\mu$ l, ならびに [ $\alpha$ - $^{32}$ P] dCTP 1 $\mu$ l。続いて反応混合物にT7 DNAポリメラーゼ (1U/ $\mu$ l) を添加する。この混合物を37 $^{\circ}$ Cで20分間インキュベートする。続いて10 $\times$ 停止溶液 (0.1M EDTA, 1mg/mlグリコーゲン) を添加して反応を終了させる。

#### 【0074】

取り込まれていない放射性標識または蛍光標識ヌクレオチドを、以下の手順を用いるサイズ排除クロマトグラフィーによって除去する: (1) ChromaSpin-200

カラム (CLONTECH) を冷凍庫から取り出し、約1時間かけて温める。続いてカラムを数回反転させ、ゲル基質を完全に懸濁化させる。カラムの底の蓋を取った後、上部の蓋を取り除く。カラムを容量1.5mlの微量遠心管に入れる。カラム基質中のゲルビーズの表面が視認できるようになるまで、重力によってカラムから水を排出させる。回収した水を捨て、以下の通りに精製を行う。試料をゲルベッドの平坦表面の中央部に注ぎ、樹脂ベッドに完全に吸着させる。ddH<sub>2</sub>O 25  $\mu$ lを注ぎ、樹脂ベッドの上部に液体が全く残らなくなるまでカラムから完全に排水させる。カラムを清浄な容量1.5mlの微量遠心管に移す。第1画分を回収するために、ddH<sub>2</sub>O 100  $\mu$ lをカラムに添加し、カラムから完全に排水させる。ほかの画分も同じ様式で回収する。続いて、この結果得られた画分に関してチェレンコフ数を計測し、チェレンコフ数が最も高い画分 (通常は画分2~3) をプールする。

#### 【0075】

##### C. ハイブリダイゼーション、X線検出または蛍光検出

上記の通りに作製した、ポリA+RNAが固定されたスライドガラスを、放射性標識または蛍光標識を行ったcDNAと混合した、クローンテック (CLONTECH) 社の「エクスプレスハイブリダイゼーション (ExpressHybridization)」溶液 (Clontech、Palo Alto, CA) 5mlとともにインキュベートする。ハイブリダイゼーション温度は50℃とする。インキュベーションは一晩行う。スライドガラスを室温の2×SSC、0.1% SDS溶液で10分間×2回、68℃の1×SSC、0.1% SDS溶液で5分間×1回、室温の0.1×SSCで5分間×1回洗う。最後に、スライドガラスを滅菌濾過水で約1分間すすぐ。ハイブリダイゼーションシグナルは、放射性標識シグナルが放出される場合にはホスホロイメージャー (phosphorimager)、蛍光シグナルが放出される場合にはフルオロイメージャー (fluoroimager) (Molecular Dynamics) を用いて検出する。

#### 【0076】

以上の結果および考察から、本アレイが、遺伝子発現解析の用途、特に標的の発現レベルおよびサイズの両方に関する情報が求められる用途における改良された方法を提供することは明らかである。本アレイは、あらかじめ作製しておいて別の使用者が後にアッセイに用いることが可能であるため、アッセイ実施者が使



用時にアレイをすべて調製するという手間を省ける。本アレイはあらかじめ調製しておくことが可能であるため、均一な規格で大量生産することができ、その結果、本装置を用いて得られる結果の同等性が保証される。さらに、本アレイは固体支持体を含むため、高スループット解析における使用、および液体取り扱い装置、読み取り装置などの自動化装置との使用には特に適する。さらに、本アレイは、当業者が現在用いている標準的な検出装置とともに容易に使用しうるように製造することが可能である。

【0077】

本明細書中に引用された全ての刊行物および特許出願は、各個々の刊行物または特許出願が、詳細におよび個々に参照として組み入れられることが意図されるように、参照として本明細書に組み入れられる。任意の刊行物の引用は、出願日の前に開示され、本発明は、先行発明によってこのような刊行物よりも日付を早める権利を与えられないように構成されるべきではない。上記発明は、理解を明瞭にするために例示および実施例によっていくらか詳細に記載されているが、特定の変更および改変が、添付の特許請求の権利の精神および範囲から逸脱することなくされ得ることは、本発明の教示を鑑みて当業者に容易に明らかである。

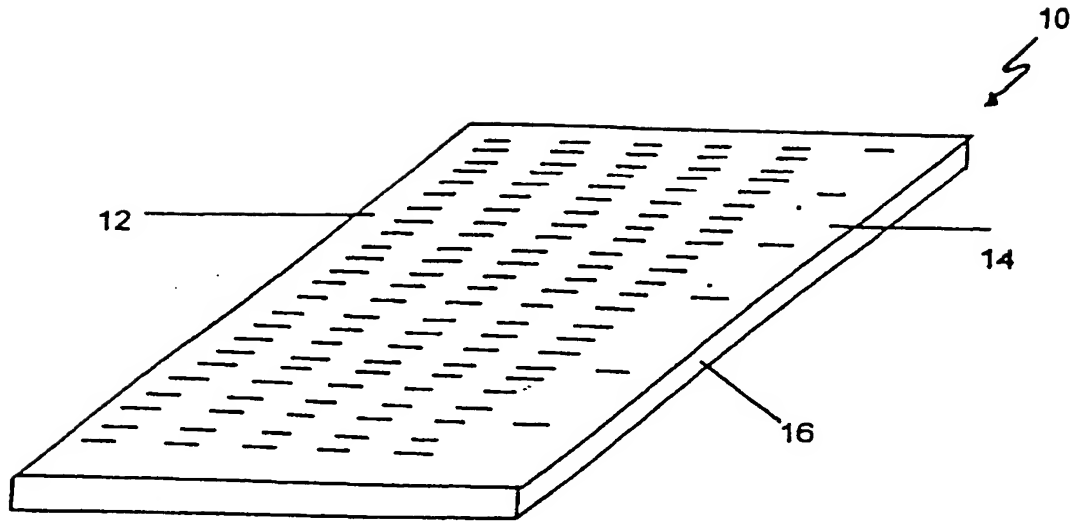
【図面の簡単な説明】

【図1】 図1は、本発明に係るアレイを示したものである。

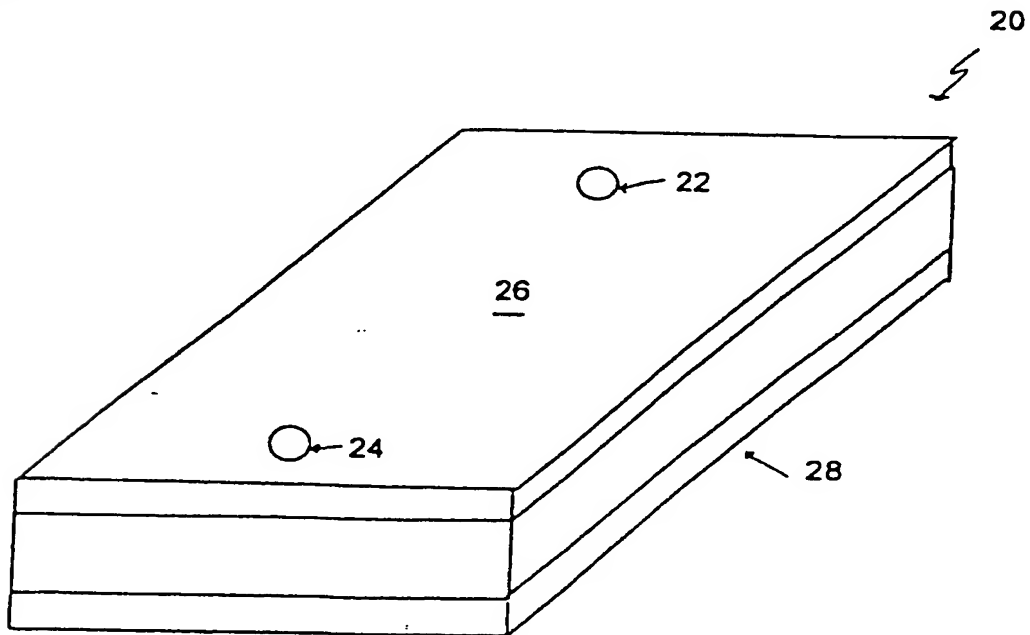
【図2】 図2は、本発明に係る「バイオチップ」の第1の態様を示したものである。

【図3】 図3は、本発明に係る「バイオチップ」の第2の態様を示したものである。

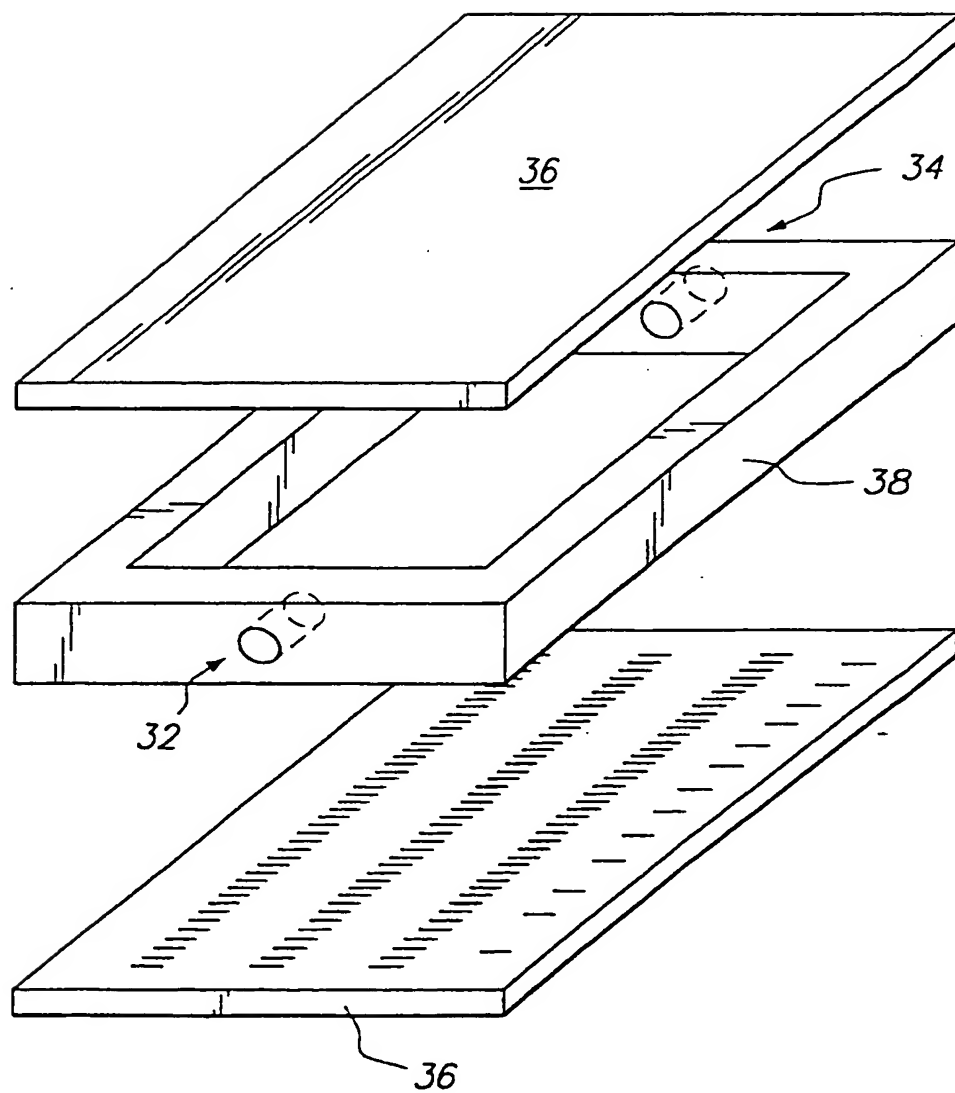
【図1】



【図2】



【図3】



## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US99/00248

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(6) : C12Q 1/68; C07H 21/04 US CL : 435 /6; 536/24.3, 24.31, 24.33; 422/350 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435 /6; 536/24.3, 24.31, 24.33; 422/350 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Extra Sheet.		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X - Y	SAMBROOK, J. Molecular Cloning A laboratory Manual. New York: second edition. Cold Spring Harbor Laboratory. 1989, Vol. 1, pages 7.37-7.52. see entire document.	1 - 4, 7, 8 - 10 12, 17, 29 30 ----- 6, 11, 18-21, 23- 25, 27 28
Y	SAMBROOK, J. Molecular Cloning A Laboratory Manual. New York: Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory. 1989, Vol. 2, pages 10.27-10.28, see entire document.	18-21
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier document published on or after the international filing date "L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "A" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 14 FEBRUARY 1999		Date of mailing of the international search report 03 MAR 1999
Name and mailing address of the ISAUS Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-9230		Authorized officer GARY JONES Telephone No. (703) 308-0196

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No.  
PCT/US99/00248

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X - Y	SAMBROOK, J. Molecular Cloning A Laboratory Manual. New York: Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory. 1989, Vol. 3 pages 18.47-18.71, see entire document.	5,13,14,16, 22 ----- 26
Y	US 5,510,270 A (FODOR et al) 23 April 1996 (04/23/96), see entire document, especially abstract	6,11
Y	US 5,610,287 A (NIKIFOROV et al) 11 March 1997 (03/11/97) see entire document.	6,11
Y	US 5,242,828 A (BERGSTROM et al) 07 September 1993 (09/07/93), see entire document, especially abstract	15,23

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US95/00248

**B. FIELDS SEARCHED**

Electronic data bases consulted (Name of data base and where practicable terms used):

APS, STN WPIDS, BIOSIS, MEDLINE, CANCERLIT, BIOTECHDS, LIFESCLCAPLUS, EMBASE

search terms: array, chip, biosensor, ma, dna, nucleic acid, polymeric target, protein, bind, attach, covalent, noncovalent, immobilize, size, separation

フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>7</sup>

識別記号

F I

テ-マコード (参考)

G O 1 N 33/53

G O 1 N 33/566

33/566

C 1 2 N 15/00

A

F タ-ム (参考) 4B024 AA11 AA19 CA09 CA11 HA12  
4B029 AA07 AA23 BB20 CC03 FA15  
4B063 QA01 QA17 QA18 QA19 QA20  
QQ52 QR08 QR32 QR36 QR42  
QR55 QR62 QS25 QS34 QS39  
QX02 QX07  
4H045 AA30 BA61 EA50 FA71 FA80

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**